

8/3 PCT

Rec'd PCT/PTO 03 OCT 2005

10/551772

Mod. C.E. - 1-4-7

MODULARIO
LCA - 101



PCT/EP 04/00 3055

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 22 JUN 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale

N. MI2003 A 000661



*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

29 APR. 2004

Roma, li

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

IL FUNZIONARIO

Paola Di Cintio
D.ssa Paola DI CINTIO

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione INDENA S.p.A.
Residenza Milano codice 04411780150
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.
via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/di/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____

"Processo per la preparazione della ferutina da piante del genere
Ferula"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Bombardelli Ezio 3) Cristoni Aldo
2) Fontana Gabriele 4) Mercalli Enrico

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>
2) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione _____

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.	PROV	n. pag.	PROV	n. tav.	contenuto
Doc. 1) <u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>20</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)....
Doc. 2) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....
Doc. 3) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	lettera d'incarico, prokuratore generale _____
Doc. 4) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	designazione inventore _____
Doc. 5) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	documenti di priorità con traduzione in italiano _____
Doc. 6) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	autorizzazione o atto di cessione _____
Doc. 7) <u>0</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	<input checked="" type="checkbox"/>	<u>1</u>	nominativo completo del richiedente _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

8) attestati di versamento, totale Euro Centottantotto/51#COMPILATO IL 04/04/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Bianchetti Giuseppe

obbligatorio

CONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO MILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MI2003A 000661

Reg. A.

codice 1115L'anno DUEMILATREil giorno QUATTROdel mese di APRILEIl(I) richiedente(i) sopradichiarato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartito.

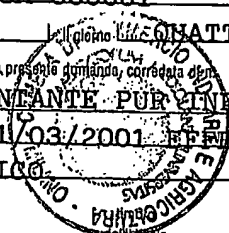
I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE IL RAPPRESENTANTE PUR INFORMATO DEL CONTENUTO

DELLA CIRCOLARE N. 423 DEL 01/03/2001 EFFETTUA IL DEPOSITO CON

RISERVA DI LETTERA DI INCARICO

Daniela Jada

DEPOSITANTE

M. CORTOMESI

L'UFFICIALE ROGANTE

NUMERO DOMANDA

M12003A 000 661

REG. A

DATA DI DEPOSITO

04/06/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

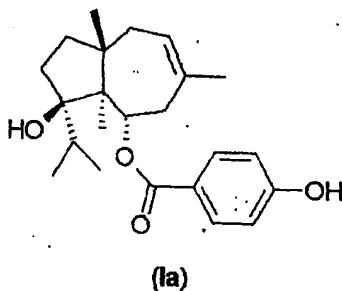
/ /

D. TITOLO

"Processo per la preparazione della ferutinina da piante del genere *Ferula*"

L. RIASSUNTO

Si descrive un processo per la preparazione di ferutinina (Ia) a partire da estratti di *Ferula spp* comprendente l'idrolisi basica di detti estratti ed il trattamento con acido *p*-pivaloilossibenzoico. Si descrive inoltre l'uso di detti estratti e di ferutinina in campo cosmetico e dermatologico.



M. DISEGNO



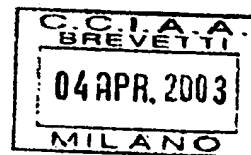
7008 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

MV/mgg "PROCESSO PER LA PREPARAZIONE DELLA FERUTININA DA
PIANTE DEL GENERE *FERULA*"

a nome : INDENA S.P.A.

con sede in : Milano

MI 2003 A 0 00 66 1



* * *

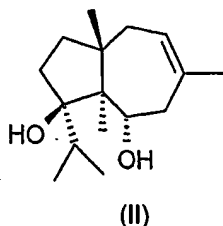
CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad estratti vegetali da *Ferula spp* e ad un procedimento per ottenere ferutina da detti estratti.

INTRODUZIONE

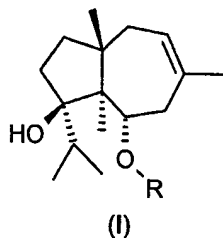
Numerose piante del genere *Ferula* contengono terpeni ad attività estrogenica, noti anche come fitoestrogeni, ossia sostanze che regolano la funzione ormonale e che sembrano rappresentare una valida alternativa all'impiego di ormoni di sintesi nel trattamento della sindrome pre-mestruale e dei disturbi legati alla menopausa e all'invecchiamento. Estratti di alcuni tipi di *Ferula* furono impiegati nell'antichità come contraccettivi, nel trattamento dell'impotenza e di problemi legati alla menopausa. Recentemente sono stati anche descritti (WO 0230438) estratti alcolici da *Ferula asafoedida L.* come antitumorali.

I composti più abbondanti nella *Ferula* sono derivati dello jaskeanadiolo (II)



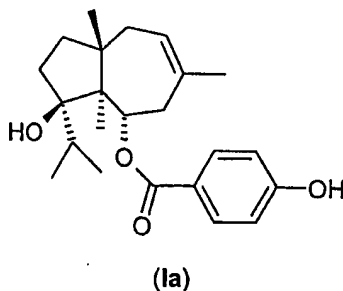
in particolare gli esteri daucanici, rappresentati dalla formula generale

(I)



Gli esteri daucanici sono composti noti e sono ad esempio descritti in *Phytochemistry*, vol. 37, n° 3, pag. 597 - 623, 1994. Nella formula (I) R rappresenta un residuo acilico alifatico lineare o ramificato, saturo o insaturo, o un residuo acilico aromatico eventualmente sostituito. Esempi di gruppi R sono iso-valeroile, angeloile, benzoile, p-idrossibenzile, veratroile o cinnammoile.

Gli esteri daucanici contenuti nella *Ferula spp* si comportano come modulatori degli estrogeni in modo simile ai SERMs (selective estrogen receptor modulators, modulatori selettivi del recettore degli estrogeni); tra questi, la ferutinina (Ia) mostra spiccata attività estrogenica, mentre gli altri hanno un'azione piuttosto blanda.



In particolare, la ferutinina è un agonista del recettore estrogeno α ($ER\alpha$) ed è un agonista/antagonista dei recettori β ($ER\beta$). E' stato inoltre dimostrato che la ferutinina ha un binding per i recettori degli estrogeni

superiore a quello del tamoxifen.

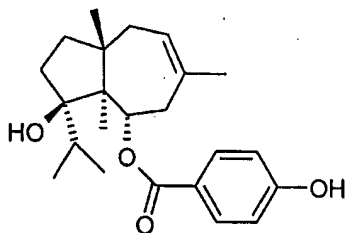
Vi è dunque la necessità di ottenere estratti arricchiti in ferutinina o di ottimizzarne l'estrazione in forma pura da materiali botanici che ne contengono precursori.

È noto dalla letteratura (J. Org. Chem. USSR (Engl. Transl.); EN; 28; 10; 1992;1666-1673) un procedimento che prevede l'idrolisi di un estratto totale di esteri daucanici a dare jaskeanadiolo grezzo e successiva riesterificazione dello jaskeanadiolo così ottenuto con acido *p*-idrossibenzoico opportunamente protetto, ad esempio con acido *p*-acetossibenzoico. Detto procedimento ha tuttavia rese piuttosto basse (circa il 45%), soprattutto a causa di reazioni di transesterificazione competitive.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che utilizzando acido *p*-pivaloilossibenzoico come agente esterificante, si evita l'instaurarsi di reazioni competitive responsabili delle basse rese di conversione descritte in letteratura.

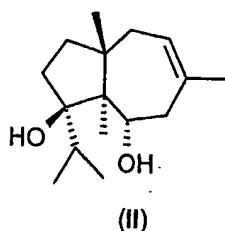
Oggetto della presente invenzione è pertanto un procedimento per la preparazione di ferutinina (Ia)



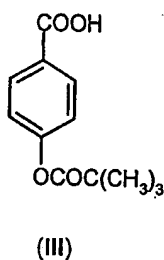
(Ia)

che comprende i seguenti passaggi:

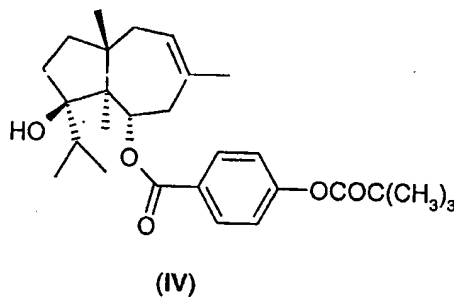
- estrazione degli esteri daucanici da *Ferula spp*;
- idrolisi basica di detti esteri a dare jaskeanadiolo (II)



- c) esterificazione dello jaskeanadiolo (II) con acido *p*-pivaloilossibenzoico (III)



- a dare *p*-pivaloilferutinina (IV)



- d) idrolisi della *p*-pivaloilferutinina (IV) a ferutinina.

Il termine "esteri daucanici" identifica composti di formula generale (I) come precedentemente definiti; tali esteri possono essere ottenuti estraendo i rizomi o le parti aeree di *Ferula spp*, preferibilmente *Ferula communis* e *Ferula hermonis*, con metodi convenzionali, ad esempio mediante estrazione con alcoli inferiori. Partendo da rizomi di *Ferula hermonis* contenenti ferutinina e l'estere benzoico dello jaskeanadiolo in rapporto 1:1, difficilmente separabili con procedimenti cromatografici, è possibile isolare ferutinina pura estraendo le radici con metanolo, trattando l'estratto con KOH



al 5% e controestraendo il saponificato con idrocarburi alifatici, eteri, esteri o solventi clorurati.

In alternativa, gli esteri daucanici possono essere ottenuti mediante estrazione con CO₂ in fase supercritica a temperatura compresa fra 35 e 65°C, preferibilmente a 45°C, e a pressione compresa fra 200 e 260 bar, preferibilmente a 245 bar. Nel separatore (o nei separatori) la temperatura è compresa fra 25 e 45°C e la pressione è di circa 50 bar. In queste condizioni sperimentali si evita l'estrazione di materiali gommosi che rendono difficile l'isolamento dei composti desiderati. Il residuo del separatore, senza ulteriori purificazioni, può essere sottoposto a saponificazione secondo quanto riportato negli esempi.

Lo jaskeanadiolo viene esterificato con l'acido *p*-pivaloilossibenzoico e nello stesso mezzo di reazione trattato con una base, preferibilmente un'ammina primaria, più preferibilmente etilendiammina, a dare ferutinina pura. Secondo una realizzazione preferita dell'invenzione, i passaggi c) e d) sono convenientemente effettuati in sequenza senza isolamento della *p*-pivaloilferutinina intermedia.

Oggetto della presente invenzione è inoltre l'uso cosmetico e dermatologico di ferutinina, *p*-pivaloilferutinina e di estratti di *Ferula spp*, preferibilmente di *Ferula communis* e *Ferula hermonis*.

Applicati sulla cute, la ferutinina e gli estratti da *Ferula spp* si sono sorprendentemente dimostrati in grado di aumentare la biosintesi del collagene e di esplicare un'azione tonica, trofica e idratante, conferendo fermezza ed elasticità. Inoltre, diminuiscono la secrezione di sebo ed apportano un contributo importante nel controllo dell'irsutismo e della

virilizzazione del volto. Pertanto, composizioni contenenti ferutinina o estratti da *Ferula spp* possono essere impiegati in campo cosmetico o dermatologico nel trattamento di rughe superficiali o profonde e di altri inestetismi, nonché nel trattamento di varie forme di acne e di seborrea.

La ferutinina e gli estratti da *Ferula spp* potranno essere formulati in forma di creme, geli, lozioni in miscela con eccipienti convenzionali, ad esempio quelli descritti in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, XVII ed., Mack Pub., N.Y., U.S.A., preferibilmente in presenza di lecitina di soia o fosfolipidi come lauroilfosfatidilcolina e miristoilfosfatidilcolina, che possono essere incorporati in emulsioni acqua/olio ed olio/acqua o incorporati in cerotti transdermici.

Gli esempi successivi illustreranno l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPI

Esempio 1 - Ottenimento dello jaskeanadiolo dalle radici della *Ferula hermonis*

250 g di radici di *Ferula hermonis* finemente polverizzate (granulometria: 2 mm), sono estratte per percolazione con 1 l di MeOH. Dopo macerazione per due giorni e percolamento del solvente, l'operazione è ripetuta (4 x 1 l), ottenendo 112,2 g di estratto metanolico (45%). L'esaurimento della droga è controllato per TLC (etere di petrolio/EtOAc 8/2, R_f ferutinina: 0,14).

L'estratto metanolico è scaldato a ricadere con 513 ml di KOH in metanolo (10%). Dopo 1 h, l'analisi TLC (etere di petrolio-EtOAc 8/2, R_f ferutinina: 0,14; R_f jaskeanadiolo: 0,31) indica che la reazione è terminata. Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è diluita con acqua (500 ml) ed

estratta con etere di petrolio (4 x 500 ml). Le fasi petroleteree riunite sono lavate con salamoia, anidificate ed evaporate. Si ottiene un residuo semicristallino che è lavato con etere di petrolio freddo (temperatura di frigorifero), ottenendo 7,5 g di jaskeanadiolo cristallino. Le acque madri sono purificate per cromatografia (50 g gel di silice, etere di petrolio-EtOAc 95:5), ottenendo α -bisabololo (870 mg), una miscela di α -bisabololo e jaskeanadiolo, e jaskeanadiolo puro (3,4 g dopo cristallizzazione). La miscela di jaskeanadiolo e α -bisabololo è unita alle acque madri ed ulteriormente cromatografata (50 g gel di silice, etere di petrolio-EtOAc 95:5), ottenendo 1,95 g di jaskeanadiolo cristallino (resa complessiva: 12,85 g, 5,1%).

Il composto ha le seguenti caratteristiche chimico-fisiche e spettroscopiche:

Spettro IR (KBr, cm^{-1}): 3339, 2965, 2905, 2875, 1470, 1375, 1047, 968, 858

Spettro di massa (C.I.)

$M^+ + 1 - \text{H}_2\text{O} = 221$; $M^+ + 1 - 2\text{H}_2\text{O} = 203$

Spettro ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : H9 5,43 m, H2 3,9 m, H14 1,78 s, H15 1,00 s, H12 0,95 d J 4,98, H13 0,91 d J 5,13.

Esempio 2 - Ottenimento dello jaskeanadiolo dalle radici della *Ferula communis*

250 g di radici di *Ferula communis* finemente polverizzate (granulometria: 2 mm) sono estratte per percolazione usando 1 l di MeOH. Dopo macerazione per due giorni e percolamento del solvente, l'operazione è ripetuta (4 x 1 l); gli estratti metanolici vengono concentrati a pari volume del peso della radice macinata e l'estratto è addizionato di 10 ml di KOH al 10%.

La soluzione alcalina è riscaldata a ricadere per 2 ore, quindi si raffredda e si controestrae per tre volte 200 ml di n-esano. L'esaurimento della droga è controllato per TLC (etere di petrolio/EtOAc 8/2)

Le fasi esaniche riunite sono lavate con salamoia, anidificate ed evaporate. Si ottiene un residuo semicristallino che è lavato con etere di petrolio freddo (temperatura di frigorifero), ottenendo 3,5 g di jaskeanadiolo cristallino. Le acque madri sono purificate secondo quanto descritto nell'esempio 1. Si ottengono 0,8 g di jaskeanadiolo avente le stesse caratteristiche chimico-fisiche di quello ottenuto secondo l'esempio 1.

**Esempio 3 - Ottenimento dello jaskeanadiolo dalle parti aeree della
Ferula communis.**

1 kg di parti aeree di *Ferula communis* finemente macinate vengono estratte in un apparecchio per l'estrazione con gas supercritici con anidride carbonica a 45°C e 245 bar. Nel separatore (o nei separatori) la temperatura è compresa fra 25 e 45°C e la pressione è di circa 50 bar. In queste condizioni si evita l'estrazione di materiali gommosi che renderebbe difficile l'isolamento dei composti desiderati. Il residuo del separatore contenente solamente sostanze lipofile ed acqua viene sciolto in metanolo e trattato con basi per l'idrolisi degli esteri dello jaskeanadiolo come riportato negli esempi 1 e 2. Si ottengono, dopo purificazione, 5,1 g di composto puro avente le stesse caratteristiche del prodotto ottenuto nell'esempio 1.

Esempio 4 - Sintesi dell'acido *p*-pivaloilossibenzoico

114,5 g di acido 4-idrossibenzoico (829 mmol) sono sciolti in 1,15 l di piridina, sotto agitazione e raffreddando a $T < 5^{\circ}\text{C}$ in bagno di ghiaccio. Alla soluzione così ottenuta si aggiungono 0,3 equivalenti (248,8 mmol, 30,4 g) di



4-dimetilamminopiridina (DMAP) e 3 equivalenti (2,487 mol, 300 g, 293,6 ml) di pivaloil cloruro. Si porta la soluzione a T_{amb} e si lascia in agitazione per 2 h. Si aggiungono 2,29 l di H_2O (reazione esotermica, raffreddare la soluzione in bagno di ghiaccio) e si lascia in agitazione per altre 3 h.

Si trasferisce la soluzione in imbuto separatore e si estrae con CH_2Cl_2 (3 x 750 ml). Le fasi clorometileniche riunite sono lavate con H_2SO_4 2 M (4 x 750 ml) e NaCl sol. satura (1 x 1150 ml), quindi anidificate con Na_2SO_4 (60 g).

Si filtra la soluzione su carta, si elimina il solvente sotto vuoto fino ad ottenere un residuo che viene spappolato con etere di petrolio 30°-50° (3 x 400 ml), filtrato su buckner e seccato sotto vuoto in stufa a 45°C per 15 h. Si ottengono 130,5 g di prodotto con le seguenti caratteristiche spettroscopiche.

Spettro IR (KBr, cm^{-1}): 3680, 2978, 2361, 1753, 1686, 1603, 1427, 1289, 1204, 1163, 1103

Spettro di massa (C.I.): $M^+ + 1 = 223$

Spettro 1H NMR (300 MHz, D-DMSO) δ H3=7 8,00 d J=8,48, H4=6 7,23 d J=8,55, CH_3 1,34 s.

Esempio 5 - Sintesi di ferutinina da jaskeanadiolo

100 g (419,5 mmol) di jaskeanadiolo sono sciolti sotto agitazione a T_{amb} in 600 ml di CH_2Cl_2 . Alla soluzione così ottenuta si aggiungono 1,4 equivalenti di acido *p*-pivaloilossibenzoico (587,3 mmol, 130,5 g) e 0,3 equivalenti di DMAP (125,9 mmol, 15,4 g). Si lascia in agitazione la soluzione per 10 min. fino a completa dissoluzione dei reagenti, quindi si aggiungono 1,8 equivalenti (755,1 mmol, 155,8 g) di N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC). Dopo 2 h la reazione è terminata.

Si concentra la soluzione fino a 2 volumi (200 ml), si diluisce con 5 volumi di CH_3CN (500 ml), si filtra via il precipitato di dicicloesilurea e lo si lava con altri 5 volumi di CH_3CN (2 x 250 ml). Le fasi organiche riunite sono trasferite in un imbuto separatore ed estratte con Na_2CO_3 10% p/v (2 x 250 ml) e NaCl soluzione satura (1 x 250 ml), quindi vengono anidificate con Na_2SO_4 (100 g). Si filtra, si elimina il solvente sotto vuoto e si ottengono 360 g di composto (IV) avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8,09 (d, $J=9,0$ Hz, $\text{H3}'\text{-H5}'$), 7,20 (d, $J=8,7$ Hz, $\text{H2}'\text{-H6}'$), 5,60 (brt, $J=4,7$ Hz, H9), 5,35 (td, $J=10,4\text{-}2,9$ Hz, H6), 2,58 (dd, $J=13,1\text{-}10,9$ Hz, H7b), 2,34 (dd, $J=14,1\text{-}2,3$ Hz, H7a), 2,07 (m, H10), 2,04 (d, $J=2,7$ Hz, H5), 1,97 (d, $J=9,7$ Hz, H2a), 1,89 (m, H11), 1,86 (s, H14), 1,63 (m, H2b), 1,57 (m, H3a), 1,41 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,30 (m, H3b), 1,14 (s, H15), 0,99 (d, $J=6,9$ Hz, H12), 0,89 (d, $J=6,7$ Hz, H13).

Il composto (IV) ottenuto nel passaggio precedente è sciolto sotto agitazione a T_{amb} in 2 l di CH_2Cl_2 . Alla soluzione così ottenuta si aggiungono 10 equivalenti di etilendiammina (280 ml). Dopo 3 h la reazione è terminata.

Si raffredda la soluzione a 0°C , si trasferisce in imbuto separatore e si lava con H_2SO_4 3 M raffreddato a 0°C (2 x 750 ml, reazione esotermica) e NaCl sol. satura (1 x 500 ml).

La fase organica è anidrificata con Na_2SO_4 (100 g). Si filtra la soluzione e si elimina il solvente sotto vuoto fino a secchezza.

Il residuo (230 g) è purificato su colonna di gel di silice (2,5 kg) equilibrata con 5,8 l di miscela esano:AcOEt = 9:1, eluendo con 70 l della stessa miscela.

Si riuniscono le frazioni contenenti il prodotto, si elimina il solvente

sotto vuoto in stufa a 45°C per 24 h.

Si ottengono 139 g (92,4%) di prodotto avente le seguenti caratteristiche spettroscopiche:

Spettro IR (KBr, cm^{-1}): 3410, 1686, 1655, 1608, 1593, 1560, 1279, 1165, 1099, 771

Spettro di massa (C.I.): $M^+ + 1 - \text{H}_2\text{O} = 341$

Spettro ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ H3'=7' 7,94 d J=8, 4'=6' 6,88 d J=8, H9 5,56 m, H2 5,23 dt J=11, H14 1,80 brs, H15 1,10 s, H13 0,94 d J=6,5, H12 0,82 d J=6,5.

Esempio 6 - Preparazione di un estratto di *Ferula hermonis*

1 Kg di pianta intera di *Ferula hermonis* viene estratto con 5 volumi di acetone per tre volte. Gli estratti acetonicici riuniti vengono concentrati a 0,5 parti rispetto al peso della biomassa iniziale e diluiti con 2 parti di acqua. La soluzione acquosa è portata a pH 7,8 con KOH diluita in presenza di esano sotto forte agitazione. Si elimina la fase esanica, si acidifica quella acquosa a pH 5 e si controestrae con n-esano. Si concentra a secco la fase esanica contenente ferutinina e si ottengono 52 g di estratto contenente circa il 35% di ferutinina.

Esempio 7 - Formulazione contenente ferutinina per trattamento di rughe superficiali.

La ferutinina viene incorporata in una crema avente la seguente composizione:

Ferutinina	0,20 g
Carbomer 934 (Carbopol 934 P - Goodrich)	0,60 g
Glicole propilenico	3,00 g

Imidazolidinilurea	0,30 g
Kathon CG	0,05 g
EDTA disodico	0,10 g
PEG-5 Steroli di soia (Generol 122 E5 - Henkel)	2,00 g
Ottildodecanolo (Eutanol G - Henkel)	4,00 g
Olio di germe di grano	4,00 g
Olio di silicone 350 cps	0,50 g
Glicerilsteato (Cutina GMS - Henkel)	7,00 g
Polisorbato 60 (Tween 60 -ICI)	5,00 g
Tocoferolo	0,20 g
Ascorbile palmitato	0,10 g
NaOH 10% sol.	2,00 g
Profumo (186909 - Dragoco)	0,20 g
Acqua depurata	q.b. a 100,00 g

Esempio 8 - Formulazione contenente estratto depurato di *Ferula hermonis* con contenuto in ferutina del 30% e del 20% in estere benzoico dello jaskeanadiolo.

Estratto di <i>Ferula hermonis</i>	0,5 g
Carbomer 934 (Carbopol 934 P - Goodrich)	0,60 g
Glicole propilenico	3,00 g
Imidazolidinilurea	0,30 g
Kathon CG	0,05 g
EDTA disodico	0,10 g
PEG-5 Steroli di soia (Generol 122 E5 - Henkel)	2,00 g
Ottildodecanolo (Eutanol G - Henkel)	4,00 g



Olio di germe di grano	4,00 g
Olio di silicone 350 cps	0,50 g
Glicerilstearato (Cutina GMS - Henkel)	7,00 g
Polisorbato 60 (Tween 60 -ICI)	5,00 g
Tocoferolo	0,20 g
Ascorbile palmitato	0,10 g
NaOH 10% sol.	2,00 g
Profumo (186909 - Dragoco)	0,20 g
Acqua depurata	q.b. a 100,00 g

Esempio 9 - Formulazione a base di ferutinina in forma di gel.

Ferutinina	0,30 g
Imidazolidinilurea	0,30 g
Metilparaben	0,20 g
Idrossietilcellulosa (Natrosol 250 HHX - Aqualon)	2,00 g
Acqua depurata	q.b. a 100 ml

Esempio 10 - Formulazione cosmetica a base di estratto di *Ferula spp*

Estratto di <i>Ferula hermonis</i>	0,5 g
Imidazolidinilurea	0,30 g
Metilparaben	0,20 g
Idrossietilcellulosa (Natrosol 250 HHX - Aqualon)	2,00 g
Acqua purificata	q.b. a 100 ml

SAGGI

Efficacia del prodotto

L'efficacia della crema dell'esempio 7 è stata determinata in uno studio in doppio cieco su 40 soggetti volontari di sesso femminile, di età compresa

fra 39 e 56 anni, valutando gli effetti sull'elasticità sulla compattezza cutanea e sulla rugometria. E' stato imposto un periodo di sette giorni di condizionamento prima dell'inizio dello studio, in cui i soggetti non dovevano utilizzare prodotti idratanti, creme solari e make-up liquidi e dovevano evitare trattamenti abbronzanti ed un'eccessiva esposizione ai raggi UV.

Ai soggetti è stato consentito l'utilizzo degli abituali prodotti per gli occhi e le labbra, ciprie e saponi non idratanti.

I soggetti sono stati suddivisi in maniera randomizzata in due gruppi, controlli (che usavano una crema placebo) e trattati (che usavano la crema dell'esempio 7). Le creme sono state applicate sulla cute del viso in quantità standardizzata (0,5 g, equivalenti a 0,5 cm di crema uscita dal tubetto) due volte al giorno, al mattino e alla sera. Prima e dopo cinque settimane di trattamento sono state effettuate le misurazioni come descritto più avanti.

Prima di ogni seduta di misurazione tutti i soggetti sono stati posti per trenta minuti in una camera climatizzata a 23°C e 50% di umidità relativa. Ad ogni misurazione sono state effettuate tre letture con corneometro, tre letture con cutometro, e una replica siliconica dell'area periorbitale, sui siti cutanei indicati più avanti.

Tutti i 40 soggetti hanno completato lo studio.

Cutometria

Il cutometro è uno strumento disponibile in commercio (Cutometer SEM 575, Courage & Khazaka, Germania), progettato per misurare le proprietà meccaniche della pelle in maniera non invasiva. Misura la deformazione verticale della superficie della pelle quando sottoposta a una pressione negativa di 500 mm Hg attraverso la piccola apertura di 2 mm di

una sonda. La lunghezza della penetrazione della pelle nella sonda è misurata otticamente con una precisione di 0,01 mm. La sonda è collegata a un computer che registra la deformazione della pelle in funzione del tempo. Da questa curva possono essere estrapolate numerose variabili per valutare il comportamento elastico, viscoelastico, e viscoso della pelle.

Sono stati registrati i seguenti parametri:

distensione immediata (U_e), misurata a 0,1 secondi;

distensione ritardata (U_v);

distensione finale (U_f), misurata a 10 secondi; e

retrazione immediata (U_r).

Il test è stato condotto usando il cutometro su ambedue i lati del viso, zona guance.

Non sono state osservate variazioni significative nel gruppo placebo. La distensione ritardata (U_v) nel gruppo trattato diminuiva significativamente (16%, $p < 0,05$) dopo 5 settimane di trattamento. Questo parametro riflette le proprietà viscoelastiche della pelle e quindi il comportamento del derma. Dopo 5 settimane, vi era anche un significativo cambiamento (-12%, $p < 0,05$) della U_e , che è principalmente influenzata dall'idratazione e dalle proprietà meccaniche dello strato corneo. La diminuzione di U_v e di U_e , insieme alla stabilità del dato U_r , depone per un aumento della compattezza cutanea.

Corneometria

L'aspetto generale della pelle morbida e liscia dipende in gran parte dalla presenza di un adeguato quantitativo d'acqua nello strato corneo.

Il corneometro è uno strumento disponibile in commercio (Corneometer CM 825 Combi 3, Courage & Khazaka, Germania) che consente di misurare i

cambiamenti della capacitanza della pelle risultanti dai cambiamenti del grado di idratazione.

Il test è stato condotto usando il corneometro su ambedue i lati del viso, zona guance.

Dopo 5 settimane, vi era un significativo cambiamento nel gruppo trattato. E' stato infatti osservato un incremento dell'idratazione cutanea pari al 17,5%, a fronte di una variazione negativa pari al 3% nel gruppo placebo.

Rugometria

Le repliche siliconiche sono state effettuate con il soggetto in posizione seduta. Le repliche (2 x 5 cm) sono state ottenute all'inizio e dopo 5 settimane, usando come materiale il "Silflo silicone impression material" (commercialmente disponibile presso Flexico, Inghilterra).

Le repliche sono state poi analizzate con il sistema Skin Image Analyzer usando il software Quantirides - Monaderm, che distingue fra microrilievi, rughe mediane e rughe profonde, calcolandone numero e profondità; infine, si ottiene il valore di area rugosa totale.

Dopo 5 settimane, vi erano significativi cambiamenti nel gruppo trattato. In particolare, è stata osservata una diminuzione dell'area rugosa pari al 21,3% ($p < 0,05$), mentre nel gruppo placebo la diminuzione è stata pari al 0,4%.

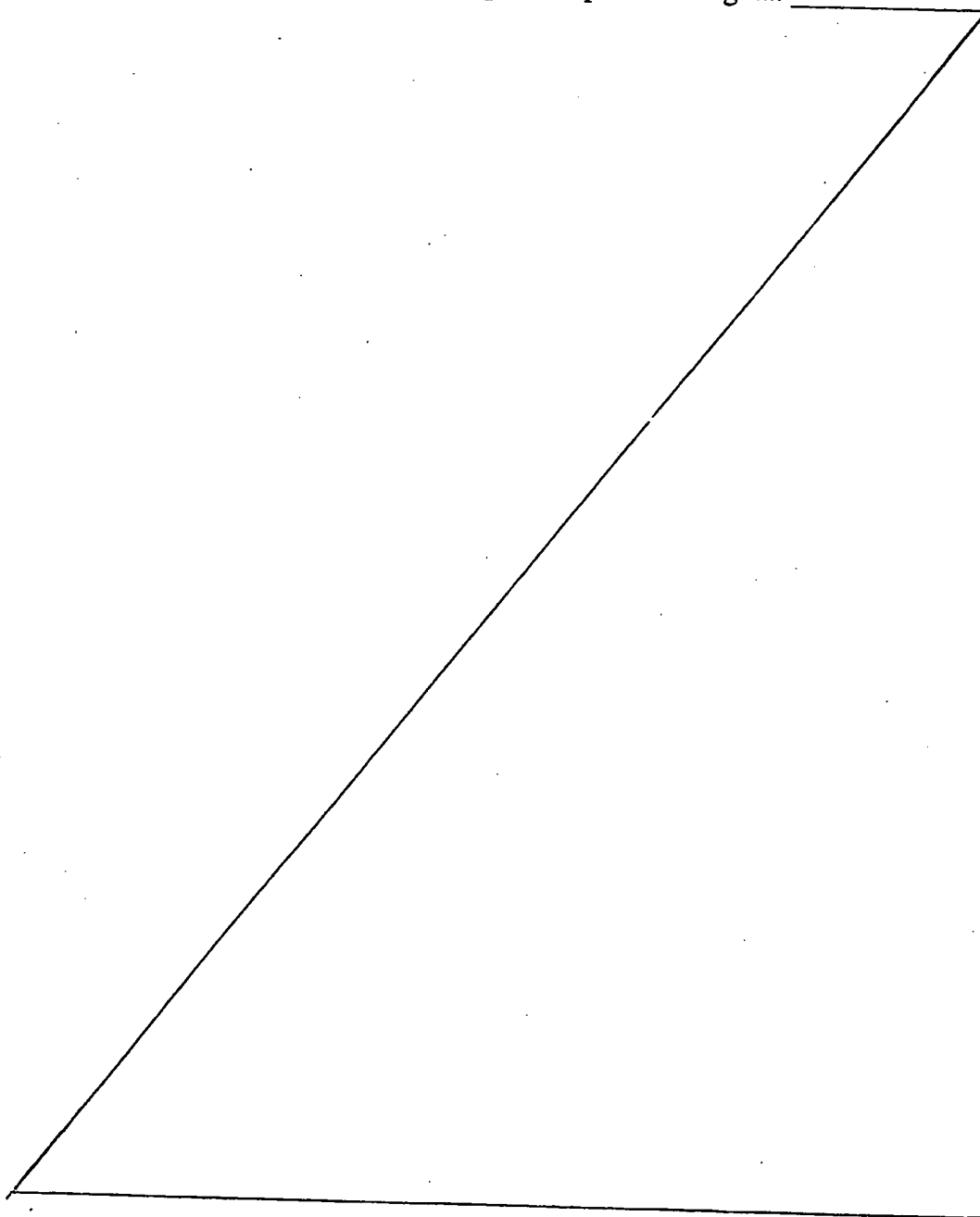
Diminuzioni statisticamente significative sono poi state osservate a carico soprattutto del numero e della profondità delle rughe mediane e profonde.

Conclusioni

Dallo studio è stato possibile concludere che la crema dell'esempio 7

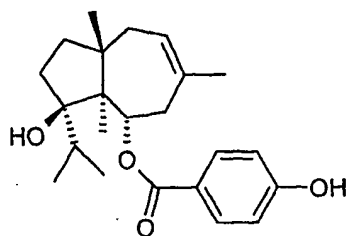


ha dimostrato una buona attività cosmetica nel trattamento della cute con segni di crono- e fotoinvecchiamento cutaneo, inducendo un aumento della compattezza e dell'idratazione cutanea e una diminuzione dell'area media che presenta rughe, in particolare una diminuzione della profondità delle micro- e macrorugosità. Infine, è stato osservato visivamente un miglioramento dell'aspetto della cute, che appariva più compatta e levigata.



RIVENDICAZIONI

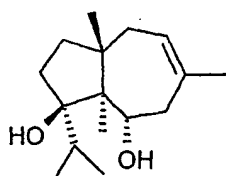
1. Processo per la preparazione di ferutina (Ia)



(Ia)

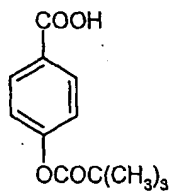
che comprende i seguenti passaggi:

- a) estrazione degli esteri daucanici da *Ferula spp*;
- b) idrolisi basica di detti esteri a dare jaskeanadiolo (II)



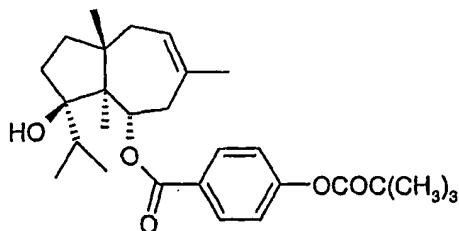
(II)

- c) esterificazione dello jaskeanadiolo (II) con acido *p*-pivaloilossibenzoico (III)



(III)

a dare *p*-pivaloilferutina (IV)



(IV)

- d) idrolisi della *p*-pivaloilferutinina (IV) a ferutinina.
2. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui gli esteri daucanici sono estratti da *Ferula communis*.
 3. Processo secondo la rivendicazione 1 in cui gli esteri daucanici sono estratti da *Ferula hermonis*.
 4. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3 in cui gli esteri daucanici sono estratti con anidride carbonica in fase supercritica a temperatura compresa fra 35 e 65°C e a pressione compresa fra 200 e 260 bar.
 5. Processo secondo la rivendicazione 4 in cui la temperatura è 45°C.
 6. Processo secondo la rivendicazione 4 o 5 in cui la separazione viene condotta a temperatura compresa fra 25 e 45°C e a pressione compresa fra 45 e 55 bar.
 7. Processo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6 in cui i passaggi c) e d) sono eseguiti in sequenza senza isolamento del composto (IV).
 8. Uso di estratti da *Ferula spp* per la preparazione di composizioni cosmetiche e/o dermatologiche.
 9. Uso di ferutinina per la preparazione di composizioni cosmetiche e/o dermatologiche.
 10. Uso di *p*-pivaloillossiferutinina per la preparazione di composizioni cosmetiche e/o dermatologiche.

Milano, 4 aprile 2003

Il Mandatario
(Bianchetti Giuseppe)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

G. Bianchetti



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.